

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 6 : G01N 33/543, C12N 11/14, C07K 17/14, G01N 33/552		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/11403
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	18. April 1996 (18.04.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01373		(81) Bestimmungsstaaten: BR, CA, CN, JP, KR, MX, SG, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 30. September 1995 (30.09.95)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: P 44 35 998.5 8. Oktober 1994 (08.10.94) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen Strasse, D-52425 Jülich (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): THUST, Marion [DE/DE]; Unkeler Strasse 19, D-50939 Köln (DE). SCHÖNING, Michael, Josef [DE/DE]; Düsseldorf Strasse 34, D-52428 Jülich (DE). VETTER, Joachim [DE/DE]; Josephstrasse 34-36, D-50678 Köln (DE). KAUPP, Ulrich, Benjamin [DE/DE]; Saarstrasse 86, D-52062 Aachen (DE). KORDOS, Peter [SK/DE]; Trierer Strasse 4, D-52428 Jülich (DE). LÜTH, Hans [DE/DE]; Eupener Strasse 299B, D-52076 Aachen (DE).			

(54) Title: PROCESS FOR IMMOBILIZING BIO-MATERIAL ON A SUBSTRATE

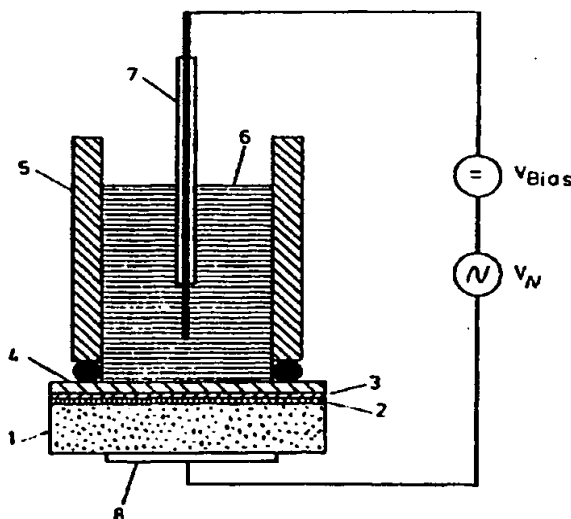
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IMMOBILISIERUNG VON BIOMATERIAL AUF EINER UNTERLAGE

(57) Abstract

In order to immobilise bio-material, e.g. enzymes, micro-organisms, cells, organelles, etc., on a substrate with a Si_3N_4 surface with bonding-active NH_2 groups, use is made of a hetero-functional cross-linking agent with a bio-material coupling function on the one hand and a NH_2 -reactive group on the other. The immobilisation substrate preferably takes the form of a 10-1000 nm thick Si_3N_4 layer which is separated from SiH_4/NH_3 by CVD and coated with bonding-active NH_2 groups by hydrolysing surface cleaning, especially with dilute acid. Advantageously, a hetero-bifunctional cross-linking agent is first caused to react with an NH_2 -reactive aldehyde, ester, halide, epoxide, imine or isocyanate group and, after the removal of unbonded superfluous cross-linking agent, coupled to the biomaterial by means of the bio-reactive group.

(57) Zusammenfassung

Zur Immobilisierung von Biomaterial, wie von Enzymen, Mikroorganismen, Zellen, Organellen etc., auf einer Unterlage mit Si_3N_4 -Oberfläche mit bindungsaktiven NH_2 -Gruppen dient ein heterobifunktionaler Crosslinker mit am Biomaterial ankoppelnder Funktion einerseits und NH_2 -reaktiver Gruppe andererseits. Vorzugsweise wird die Immobilisierungsunterlage durch eine 10 - 1000 nm dicke Si_3N_4 -Schicht gebildet, die aus SiH_4/NH_3 durch CVD abgeschieden und durch hydrolysierende Oberflächenreinigung, insbesondere mit verdünnter Säure, mit bindungsaktiven NH_2 -Gruppen versehen wird. Zweckmäßigerweise wird ein heterobifunktionaler Crosslinker mit NH_2 -reaktiver Aldehyd-, Ester-, Halogenid-, Epoxid-, Imin- oder Isocyanatgruppe zunächst mit der Si_3N_4 -Oberfläche zur Reaktion gebracht und nach Entfernung von nichtgebundenem überschüssigen Crosslinker mittels der bioreaktiven Gruppe an das Biomaterial angekoppelt.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauritien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	ML	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Beschreibung

Verfahren zur Immobilisierung von Biomaterial auf einer Unterlage

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Immobilisierung von Biomaterial auf einer Unterlage mit Si_3N_4 -Oberfläche, an die das Biomaterial über Bindungsvermittler kovalent gebunden ist.

5 Die Immobilisierung von Biomaterial ist für die Ausnutzung von Bioaktivität, insbesondere bei Flüssigkeitskontakt, von erheblicher Bedeutung. Sie spielt sowohl in der Verfahrenstechnik als auch in der Analytik bei Trennoperationen oder für die wiederkehrende Ausnutzung der Biofunktion eine große Rolle. Weitere Interessengebiete sind im Pharma- und Medizinbereich sowie in der Umwelttechnik zu
10 sehen.

Bekannt sind zahlreiche Versuche zur Immobilisierung von Biomaterial an unterschiedlichen Oberflächen, auch mineralischer Art wie Glas, das im allgemeinen zunächst silanisiert wird.

15 Von E. Tamiya et al. wird im J. Mol. Catal. 43 (1988) 293-301 eine Immobilisierung von Urease an einem mit dünner Silberschicht versehenen Quarzkristall beschrieben, auf dessen Oberfläche eine Siliciumnitridschicht aufgesputtert wird. Der so behandelte Kristall wurde 24 h an Luft gelagert, gewaschen und im Luftbad getrocknet. Danach erfolgte eine Bedampfung mit γ -Amino-propyl-triethoxysilan,
20 gefolgt von einer Bedampfung mit Glutaraldehyd. Der so erzeugte dünne organische Oberflächenfilm von ca. 100 Å Dicke wird als wenig porös bezeichnet. Eine Verknüpfung von Silan und Aldehyd konnte nicht richtig beobachtet werden.

Das aus wäßriger Lösung am Film angelagerte Enzym hatte eine Aktivität relativ zur freien Urease von nur 2,25 %. Dieses Immobilisierungskonzept erscheint nicht voll befriedigend.

- 5 Gegenstand der Erfindung ist eine neue Art der Biomaterial-Fixierung, die mit einer geringen Zahl von Behandlungsschritten auskommt und auf reproduzierbare Weise zu relativ beständigen Produkten führt.

- 10 Das erfindungsgemäße Verfahren zur Immobilisierung von Biomaterial auf einer Unterlage der eingangs genannten Art ist im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß man auf der Immobilisierungsunterlage eine Si_3N_4 -Oberfläche mit bindungsaktiven NH_2 -Gruppen vorsieht, mit denen ein heterobifunktioneller Crosslinker mit NH_2 -reaktiver Aldehyd-, Ester-, Halogenid-, Epoxid-, Imin- oder Isocyanatgruppe einerseits und einer biomaterial-reaktiven Gruppe andererseits zur Reaktion ge-
15 bracht wird, an den dann das Biomaterial angekoppelt wird.

Weitere Besonderheiten der Erfindung ergeben sich aus den Patentansprüchen.

Die Erfindung ist für die Immobilisierung von Enzymen, Mikroorganismen, Zellen, Antikörpern, Antigenen, Organellen, Gewebeschnitten usw. auf Unterlagen wie Halbleitersubstraten, Folien, Wandflächen, Granulaten, Bauteilen, insbesondere mineralischer Art, geeignet und in Anwendungsbereichen, wie eingangs genannt, nützlich.

Siliciumnitrid-Oberflächen können u.a. durch CVD-Technik aus einem SiH_4/NH_3 -Gemisch abgeschieden werden (siehe A. Garde et al. ESSDERC 1994 - 11.-15. Sept. 1994 Ed. C. Hill & P. Ashburn). Sie nehmen an Luft Sauerstoff auf und neigen bei Einwirkung von Feuchtigkeit zur Hydrolyse unter Bildung von Si-OH, Si-NH und Si-NH₂ Gruppen. Diese Gruppen können als reaktive Funktionen für die Anknüpfung von Biomaterial über Crosslinker an die Nitridoberfläche ausgenutzt werden.

Besonders zweckmäßig wird beim erfindungsgemäßen Verfahren eine durch Behandlung mit verdünnter Flußsäure von Oxiden befreite Si_3N_4 -Oberfläche benutzt und in zwei Schritten für eine kovalente Enzym-Ankopplung gesorgt, indem ein Crosslinker gewählt wird, dessen eine Funktion zunächst mit den NH₂-Gruppen oder auch NH-Gruppen der Nitridoberfläche reagiert und dessen zweite Funktion nachfolgend mit dem Protein umgesetzt wird. Alternativ kann der Crosslinker auch zuerst mit dem Protein umgesetzt, und das Produkt dann mit der Si_3N_4 -Oberfläche zur Reaktion gebracht werden.

Als NH₂-reaktive Gruppen des Crosslinkers bieten sich insbesondere Aldehyd-, Halogenid-, Epoxid-, Imid- oder Isocyanatfunktionen an. Eine Vielzahl von Reaktionsmöglichkeiten mit Aminogruppen findet sich im übrigen z.B. in der US-PS 5 234 820. Für die Praxis werden

bereits unterschiedliche Verbindungen von der Fa. Pierce im "Immuno Technology Catalog & Handbook" von 1992/3 angeboten.

- 5 Für die Umsetzung mit dem Biomaterial werden Cross-linker-Funktionen ausgenutzt, die zu einer kovalenten Bindung über funktionelle Gruppen des Enzyms befähigt sind, insbesondere mit terminalen Carboxy-Gruppen oder Seitenkettengruppen, wie -SH, -COOH oder -OH Gruppen
- 10 oder aromatischen Ringen. Erfindungsgemäß wird die Anbindung des Biomaterials an die Nitridoberfläche mithin unter Ausnutzung eines heterobifunktionellen Crosslinkers angestrebt, wobei als heterobifunktio-
- 15 neller Crosslinker hier auch ein solcher Crosslinker verstanden werden soll, der zwei grundsätzlich chemisch gleichartige Funktionen aber mit unterschiedlicher Reaktivität gegenüber den unterschiedlichen Um-
- 20 setzungspartnern aufweist.
- 20 Die heterobifunktionellen Crosslinker werden schrittweise mit der Si_3N_4 -Oberfläche und dann mit dem Protein umgesetzt. Die nachfolgend im einzelnen angegebenen aminospezifischen Reaktionen laufen bei Raumtemperatur in neutralem bis leicht alkalischem pH-Wert ab.
- 25 Erhöhung sowohl der Temperatur als auch des pH-Werts steigert die Reaktionsgeschwindigkeit, jedoch auch die Hydrolyserate des Crosslinkers. Der benutzte Puffer sollte weder Amine noch andere Verbindungen enthalten, mit denen die funktionellen Gruppen des Crosslinkers reagieren könnten.
- 30 N-Hydroxysuccinimidester reagiert spezifisch mit primären Aminen. Unter Abspaltung von N-Hydroxysuccinimid entsteht eine Amidbindung zwischen dem primären Amin und der Restgruppe des verwendeten Esters. Sofern kein wasserlösliches Analogon verwendet wird, muß ein Crosslinker, der diese funktionelle Gruppe besitzt zuerst in einer kleinen Menge eines
- 35 organischen Lösungsmittels (z. B. DMSO) gelöst und erst dann auf die Endkonzentration in wäßrigem Puffer verdünnt werden. Die Ionenstärke des Puffers sollte nicht zu hoch sein um

Aussalzungseffekte zu vermeiden. Ein leicht alkalischer pH-Wert (7-9) garantiert, daß sich die primären Amine in unprotoniertem Zustand befinden.

Aldehyde verfügen über eine stark reduzierende Carbonylgruppe. Diese reagiert mit primären Aminen unter Wasserabspaltung.

- 5 Die Reaktion von primären Aminen mit Imidoestern läuft im pH-Bereich zwischen 8 und 9 ab. Der Ester wird dabei abgespalten und das primäre Amin bildet mit der Imidogruppe eine Guanidinoverbindung.

- Die Anbindung an das Protein geschieht nun mithilfe der zweiten noch freien funktionellen Gruppe des Crosslinkers. Diese kann spezifisch oder unspezifisch mit Thiol-, Carboxyl- oder Carbohydratgruppen des Proteins reagieren.
- 10

- Besitzt der Crosslinker als zweites funktionelles Ende eine thiol-spezifische Gruppe wie Maleimid, ein aktiviertes Halogenid oder Pyridyldisulfid, so muß das zu bindende Protein eine freie Sulfhydrylgruppe (üblicherweise von einem Cysteinrest) besitzen. Sollte diese nicht verfügbar sein, so kann sie durch Reduktion von Proteindisulfiden generiert werden. Alternativ können primäre Amine des Proteins so modifiziert werden, daß Sulfhydrylgruppen zur Verfügung stehen (Trauts Reagenz). Um Oxidation dieser Gruppen zu vermeiden, muß verwendete Puffer entgast werden. Zugabe des Komplexbildners EDTA verhindert die Oxidation durch etwaige in der Lösung vorhandene Metalle.
- 15

- Maleimid reagiert in leicht saurem bis neutralem Milieu (pH 6,5-7,5), während für Halogenide und Pyridyldisulfid pH-Werte größer oder gleich 7 zu empfehlen sind.
- 20

- Glycolysierte Proteine können über die Hydroxygruppe an den Zuckerseitenketten vernetzt werden. Wird ein carbohydrataktiver Crosslinker benutzt, der als funktionelle Gruppe z. B. ein Hydrazid besitzt, so muß die Carbohydratgruppe des Proteins zunächst zu einem Aldehyd oxidiert werden (z. B. mit NaIO_4). Die entstehende Carbonylgruppe reagiert dann mit dem Hydrazid zu Semicarbazon.
- 25

Eine Möglichkeit der direkten Verknüpfung zwischen Carboxy- und Aminogruppen besteht durch die Reaktion mit Carbodiimiden. Im saurem pH-Bereich (4-5) überführen

Carbodiimide die Carboxygruppe in eine aktivierte Esterbindung. Diese reagiert mit primären Aminen unter Ausbildung einer Amidbindung und Abspaltung von Harnstoff.

Bei Verwendung eines Crosslinkers, dessen nicht-aminospezifisches funktionelles Ende eine photoaktivierbare Gruppe (z. B. Azidophenyl) aufweist, muß die gesamte Immobilisierung in einer Dunkelkammer unter Rotlicht durchgeführt werden. Die Azidogruppe von Azidophenyl wird durch Lichteinstrahlung der Wellenlänge 265-275 nm aktiviert.

Die Erfindung ist für die Anbindung unterschiedlichster Biomaterialien an Unterlagen oder Träger allgemeinsten Art brauchbar. Sie wurde speziell am Beispiel von Penicillinsensoren getestet, weshalb sich die nachfolgende Beschreibung auf solche bezieht. Dabei wird auf die angefügten Bezeichnungen Bezug genommen. Diese zeigen schematisch:

Fig. 1 ein Sensorprinzip (Meßanordnung),

Fig. 2 eine typische Meßkurve für einen Konzentrationsbereich von 10^{-4} bis 10^{-1} Mol/l Penicillin und

Fig. 3 die Kalibrierungskurve eines erfindungsgemäßen Sensors.

Beispiel:

Auf p- bzw. p⁺-dotierten Siliciumwafern (1 mOhmcm - 30 Ohmcm) wurde zuerst eine elektrisch nicht leitende Schicht von Siliciumdioxid mit einer Dicke von 5 - 100 nm durch thermische Trockenoxidation zwischen 700 und 1200 °C (hier bei 1000 °C) in einem Diffusionsofen erzeugt. Darauf wurde ebenfalls nicht leitendes Siliciumnitrid mit einer Dicke von 10-100 nm durch chemische Abscheidung in der Gasphase (PECVD) aufgebracht. Das Verhältnis SiH₄/NH₃ im Reaktionsgas betrug 2/1, die Substrattemperatur 200 - 500 °C (hier 300 °C) und der Druck während der Abscheidung 1 - 3 Torr (hier 1,5 Torr). Es folgte ein Temperschritt unter N₂-Atmosphäre (5-60 Minuten bei 700-1000°C). Schließlich wurde die unpolierte Substratseite mit einem Ohmschen Kontakt (z. B. 10 - 1000 nm Al, Au) versehen. Das verwendete Material wurde durch thermisches Aufdampfen im Vakuum bei einem

Basisdruck $< 10^{-5}$ mbar aufgebracht. Die Abscheidungsrate lag zwischen 0,1 und 10 nm/s. Anschließend wurde der Wafer in einem RTA-Ofen bei 150 - 500 °C (hier 400 °C) in N₂-Atmosphäre getempert.

Unmittelbar vor Beginn des Enzymimmobilisierungsprozesses wurden die Wafer in Aceton, 2-

- 5 Propanol und destilliertem Wasser im Ultraschallbad gereinigt und 10 - 60 s (hier 30 s) in verdünnter Flußsäure (1-10% HF) geätzt.

Bei Verwendung des heterobifunktionellen Crosslinkers ANB-NOS (N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimide) wurde dieser zunächst in einer kleinen Menge DMSO gelöst und dann mit 0,2 M Triethanolaminpuffer (pH 5-9) auf eine Endkonzentration von 0,5-10 mM

- 10 verdünnt. Diese Lösung wurde auf die Si₃N₄-Oberfläche aufgebracht und zwischen 5 und 40 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Bei niedrigerer Temperatur muß länger inkubiert werden. Nicht an die Siliciumnitridoberfläche gebundene Moleküle wurden durch Abspülen mit Triethanolaminpuffer (TEA) entfernt. Danach wurde das Enzym (Penicillinase Typ 1 aus Bacillus Cereus, Sigma P 0389) in einem Puffer, der keine Aminogruppen enthält (z. B. TEA, 15 insbesondere nicht TRIS- oder Glycinpuffer) gelöst (1000-5000 Units/ml) und auf die mit Crosslinker vorbehandelte Siliciumnitridoberfläche gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1-240 min (hier 15 min) bei Temperaturen zwischen 4 und 60 °C, insbesondere bei Raumtemperatur wurde die Anbindung der Enzymmoleküle an die noch freie funktionelle Gruppe des Crosslinkers durch Licht im Wellenlängenbereich von 320-350 nm induziert. Nach 20 Abschluß des Immobilisierungsverfahrens wurden die einsatzfähigen Penicillinsensoren mit 0,1 M TRIS-Puffer (pH 7-8) und destilliertem Wasser gespült und mindestens 10 Minuten an Luft bzw. unter N₂- oder Inertgasatmosphäre getrocknet.

- 25 Mit den auf diese Weise hergestellten Feldeffektsensoren wurden Messungen zur Bestimmung der Penicillinkonzentration in wäßrigen Lösungen durchgeführt.

In Fig. 1 ist die Meßanordnung schematisch dargestellt. Der erfindungsgemäß hergestellte Feldeffektsensor bestehend aus dem Siliciumsubstrat 1, der Isolatorschicht 2 (Siliciumdioxid und Siliciumnitrid), der Crosslinkerschicht 3 und der Enzymschicht (Penicillinschicht) 4 wurden

in eine Meßzelle integriert. Die Meßzelle wurde mit einer wäßrigen Meßlösung befüllt, die Penicillin G in einer Konzentration zwischen 10^{-5} und 1 Mol/l enthielt. In die Meßlösung 6 taucht eine Referenzelektrode (z. B. Ag/AgCl) 7 ein. Die Potentiale werden über die Referenzelektrode 7 und eine Kontaktelektrode 8 am Siliciumsubstrat abgegriffen.

5

In Fig. 2 ist eine typische Meßkurve dargestellt, die im CONCAP (CONstant CAPacitance) - Modus im Konzentrationsbereich zwischen 10^{-4} und 10^{-1} Mol/l Penicillin aufgenommen wurde. Penicillin G Natriumsalz (Sigma P 3032) wurde dazu in 10 mM TRIS-HCl Puffer, $\text{pH } 7$ gelöst. Mit steigender Penicillinkonzentration steigt die Konzentration der gebildeten Penicilloinsäure und somit die Konzentration der Wasserstoffionen in unmittelbarer Nähe der als pH -Transduktor wirkenden Siliciumnitridfläche. Dies hat eine Verschiebung des Potentials an der Grenzfläche Siliciumnitrid/Elektolyt zu positiveren bzw. negativeren Spannungswerten hin zur Folge. Die Auftragung über der Zeit erlaubt eine Beobachtung des konzentrationsabhängigen Potentialverlaufs der Enzymreaktion. Zu gekennzeichneten Zeiten fand der Wechsel der Meßlösungen statt.

10

15

Fig. 3 zeigt die aus Fig. 2 ermittelte chemische Übertragungskennlinie. Sie stellt die Kalibrierungskurve des erfindungsgemäß hergestellten Feldeffektsensors dar. Angaben über die Sensitivität eines potentiometrischen Chemo- oder Biosensors werden im Hinblick auf den zugrundeliegenden Nernstschen Zusammenhang im linearen Bereich dieser Kurve, d. h. in dem Bereich, in dem ein logarithmischer Zusammenhang zwischen der Penicillinkonzentration und dem anliegenden Potential besteht gemacht. Dieser Bereich liegt im erfindungsgemäß hergestellten Sensor zwischen $\text{pPenicillin } 2,3$ und $3,3$, was $0,5$ und 5 mM entspricht. Die Empfindlichkeit beträgt 50 mV pro Dekade.

20

25

Die exakte Lage des linearen Meßbereichs und die absolute Empfindlichkeit hängen wesentlich von der Wahl der Pufferzusammensetzung, dessen Konzentration, d. h. der Pufferkapazität und dem pH Wert ab. Durch geeignete Wahl dieser Parameter kann der für eine Messung erforderliche Meßbereich gezielt eingestellt werden. Beispielsweise liegt der lineare

Meßbereich bei Verwendung von IMIDAZOL-Puffer (pH 7) zwischen 2 und 20 mM Penicillin, für HEPES-Puffer etwa zwischen 1 und 10 mM. Erhöhung des pH-Werts verschiebt die Lage der linearen Bereiche der Kalibrationskurven zu höheren Penicillinkonzentrationen hin, Erniedrigung entsprechend zu niedrigeren.

5

Die erfindungsgemäß hergestellten Sensoren weisen eine hohe Langzeitstabilität von mehr als 140 Tagen auf. Die Empfindlichkeit liegt bei 50 mV pro Penicillindekade.

10

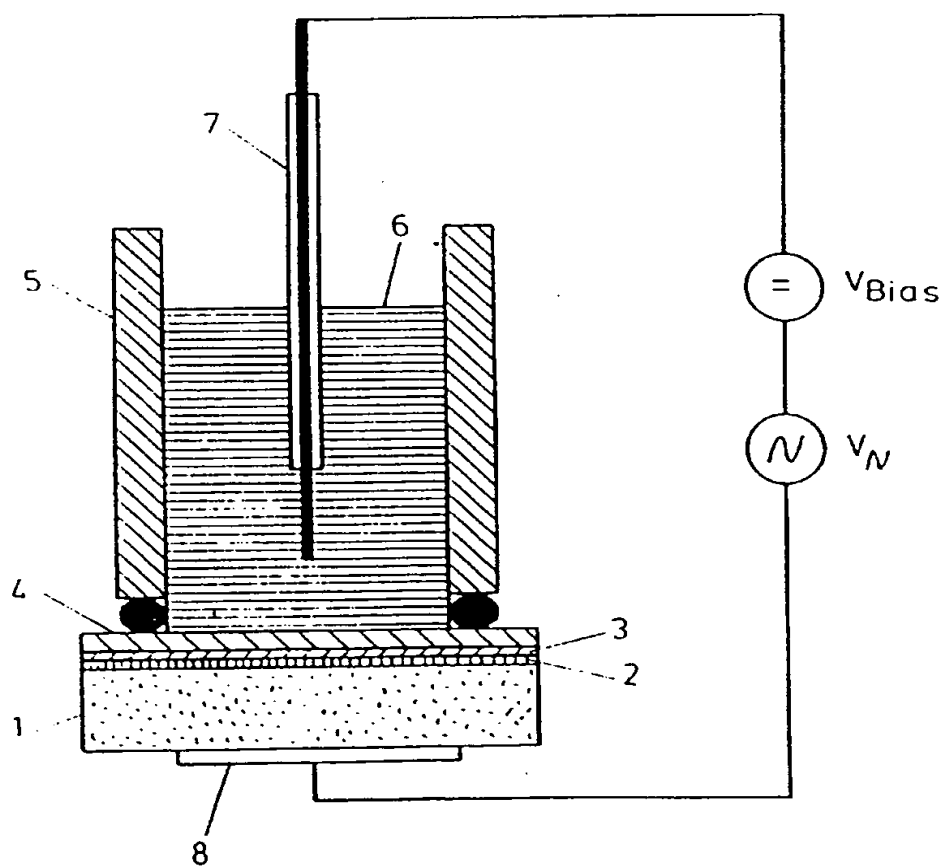
Die Herstellung eines Feldeffekttransistors, der im Gatebereich einen gleichartigen Aufbau wie die in der Erfindung beschriebene kapazitive Schichtstruktur aufweist ist möglich.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Immobilisierung von Biomaterial auf einer Unterlage mit Si_3N_4 -Oberfläche, an die das Biomaterial über Bindungsvermittler kovalent gebunden wird,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß man auf der Immobilisierungsunterlage eine Si_3N_4 -Oberfläche mit bindungsaktiven NH_2 -Gruppen vorsieht, mit denen ein heterobifunktionaler Crosslinker mit NH_2 -reaktiver Aldehyd-, Ester-, Halogenid-, Epoxid-, Imin- oder Isocyanatgruppe einerseits und einer biomaterial-reaktiven Gruppe andererseits zur Reaktion gebracht wird, an den dann das Biomaterial
10 angekoppelt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die am biomaterialreaktive Gruppe oder Funktion des Crosslinkers eine mit
15 terminalen oder Seitenkettenfunktionen von Proteinen reagierende Gruppe ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein Crosslinker mit einer mit Carboxyl-, Sulfhydryl- oder Hydroxygruppen
20 reagierenden oder an aromatische Ringe ankuppelnden biomaterial-aktiven Gruppe gewählt wird.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche
dadurch gekennzeichnet,
daß auf der Immobilisierungsunterlage eine 10 -
1000 nm dicke Si_3N_4 -Schicht durch CVD aus einem
5 SiH_4/NH_3 -Gemisch abgeschieden und durch hydroly-
sierende Oberflächenreinigung mit bindungsaktiven
 NH_x -Gruppen versehen wird.
- 10 5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Biomaterial Enzyme, Mikroorganismen,
Zellen, Antikörper, Antigene, Organellen oder
Gewebeschnitte auf Halbleitersubstraten, Folien,
15 Wandflächen oder Granulaten insbesondere minera-
lischer Art fixiert werden.
- 20 6. Verfahren in Abwandlung von Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man für die Anbindung mittels des Crosslinkers
diesen zunächst mit dem Biomaterial zur Reaktion
bringt und danach für die Verknüpfung mit der
20 Si_3N_4 -Oberfläche sorgt.

Fig. 1



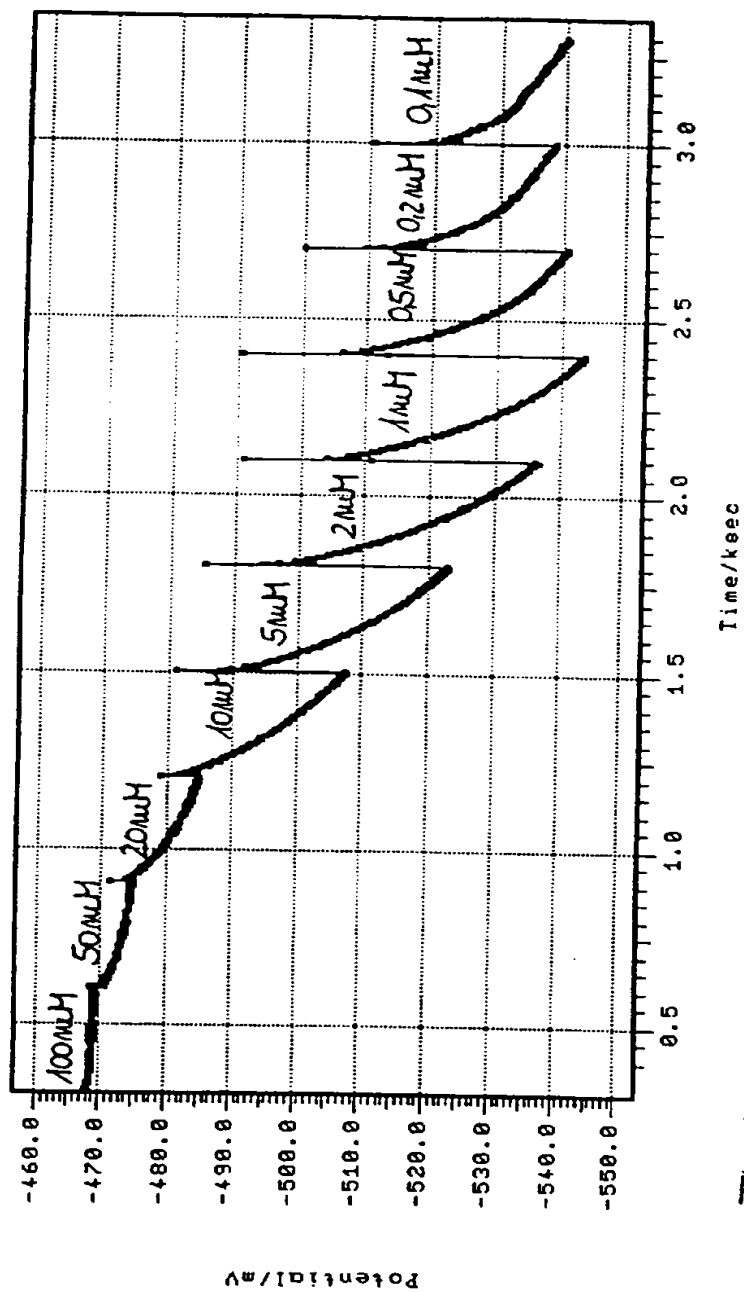


Fig.2

Potential (mV)

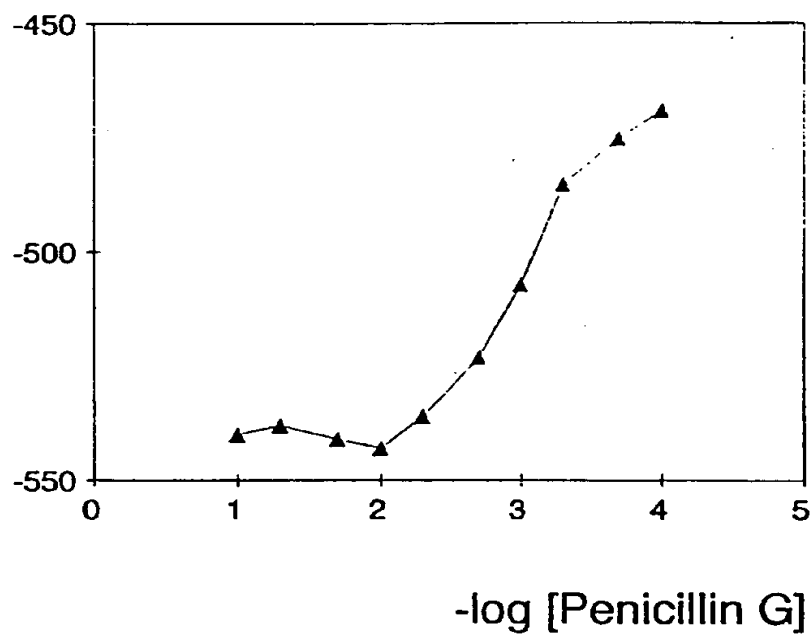


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/DE 95/01373

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N33/543 C12N11/14 C07K17/14 G01N33/552		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS, vol. 43, no. 3, - 1988 AMSTERDAM NL, pages 293-301, XP 000562703 E. TAMIYA ET AL. 'Characterization of immobilized urease membrane on silicon nitride layer.' cited in the application see the whole document ---	1-6
Y	US,A,5 234 820 (F.W. WAGNER ET AL.) 10 August 1993 cited in the application see the whole document ---	1-6
A	EP,A,0 350 073 (ASPEN DIAGNOSTICS INCORPORATED) 10 January 1990 see column 13, line 13 - line 19 see column 13, line 34 - line 35 ---	1-6
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. 'A' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 February 1996		Date of mailing of the international search report - 5. 03. 96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer Van Bohemen, C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter- vial Application No
PC1/DE 95/01373

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, - 7 September 1986 ANAHEIM CA USA, page 13 XP 000563391 T. YANG ET AL. 'Covalent immobilization of immunoglobulin to polystyrene and silican nitride chips' see the whole document -----</p>	1-6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

Printed from Mimosa

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PC 1/DE 95/01373

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-5234820	10-08-93	US-A- 5279954	18-01-94
		AU-B- 646638	03-03-94
		AU-B- 6030090	17-01-91
		CA-A- 2063434	31-12-90
		EP-A- 0479897	15-04-92
		JP-T- 4506454	12-11-92
		WO-A- 9100296	10-01-91

EP-A-350073	10-01-90	US-A- 5089387	18-02-92
		AU-B- 3793289	11-01-90
		JP-A- 2118437	02-05-90

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter: nationales Aktenzeichen

PC1/DE 95/01373

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N33/543 C12N11/14 C07K17/14 G01N33/552

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS, Bd. 43, Nr. 3, - 1988 AMSTERDAM NL, Seiten 293-301, XP 000562703 E. TAMIYA ET AL. 'Characterization of immobilized urease membrane on silicon nitride layer.' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-6
Y	US,A,5 234 820 (F.W. WAGNER ET AL.) 10. August 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-6
A	EP,A,0 350 073 (ASPEN DIAGNOSTICS INCORPORATED) 10. Januar 1990 siehe Spalte 13, Zeile 13 - Zeile 19 siehe Spalte 13, Zeile 34 - Zeile 35 --- -/-	1-6

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Februar 1996

Abschließendes Datum des internationalen Recherchenberichts

- 5. 03. 96

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Van Bohemen, C

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

Seite 1 von 2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PC:/DE 95/01373

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, - 7.September 1986 ANAHEIM CA USA, Seite 13 XP 000563391 T. YANG ET AL. 'Covalent immobilization of immunoglobulin to polystyrene and silican nitride chips' siehe das ganze Dokument -----</p>	1-6

Formblatt PCT/ISA/218 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

Seite 2 von 2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 95/01373

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A-5234820	10-08-93	US-A- 5279954	18-01-94
		AU-B- 646638	03-03-94
		AU-B- 6030090	17-01-91
		CA-A- 2063434	31-12-90
		EP-A- 0479897	15-04-92
		JP-T- 4506454	12-11-92
		WO-A- 9100296	10-01-91

EP-A-350073	10-01-90	US-A- 5089387	18-02-92
		AU-B- 3793289	11-01-90
		JP-A- 2118437	02-05-90

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie/Juli 1992)